

平成 H26-28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究分担研究  
総合分担報告書

試験法の妥当性評価・衛生指標菌

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長  
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授

微生物試験法の妥当性確認（バリデーション）あるいは検証（ベリフィケーション）に際しては、国際的に認証されたスキームで実施することが要請される。そのスキームの手本とされてきた ISO16140 の改訂版が 2016 年 6 月に出た。変更内容には、AOAC:2012.2 版ガイドラインの内容に合わせた、と推察される部分が少なからずあった。ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」と改訂版では多くの Part に分かれた。確定試験（Confirmation）やペアード・アンペアードスタディ（paired/unpaired study）などの新しい概念が随所に加わっている。こうした国際動向を反映し、かつ我が国において実現可能なガイドラインとすべく、Part1 を参照しつつ、Part2 の章構成に合わせて妥当性ガイドライン案を作成した。本文は概ね完成した。一方、生菌標準物質の開発に関しては、これまで実用化を困難にしていた、オフサイトでの調製技術の見通しを立てることができた。すなわち、チミジン・ゼラチン重層法によって、セルソーターで調製した生菌が、1 週間の冷蔵保存後、95%以上のコロニー形成率を示した。1 週間は世界中に輸送するのに十分な時間である。我が国は、平成 24 年頃から食品の微生物試験法を担当する ISO TC34/SC9 の総会に積極的に参加し、平成 29 年総会の東京開催に向けて P メンバーとなる予定であるが、その活動に積極的に関わっている。

### A. 研究目的

我国から発信する微生物試験法を国際的に通用するものにするには、国際的に認証されたスキームによって妥当性確認（バリデーション）しなければならない。一方、バリデーションされた試験法を事業者等が導入する際には、それが確実に実施できることを検証（ベリフィケーション）しなければならない。いずれの場合も、基本となるのは国際的に認証されたスキームである。従来から、そのモデルとして AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003 等を精査してきたが、ISO16140 は 2016 年 6 月に大幅に改訂された。本研究では、こうした国際的な改訂動向を反映させた最新版ガイドライン

案を作成することを、第一の目的とした。また、同時に行われた、セレウス菌、セレウリド、エルシニア・エンテロコリチカ、衛生指標菌の標準法作成に際して、バリデーションの観点から専門的意見を述べた。

一方、妥当性確認において重要な生菌標準物質に関しては、既にフローサイトメトリーを利用したオンサイト調製法が開発されていたが、本研究では、これを実用化させるための諸課題を解決することを第二の目的とした。すなわち、食品中の少数生菌検出法のバリデーションに適用すること、実用上問題となっていた損傷菌の標準物質を調製すること、さらに世界中のどこへ移送しても利用できる

ようなオフサイト調整法を開発すること、などである。

## B. 研究方法

### (1) バリデーション・ガイドラインの作成

通知文書として公開する際の懸案事項に関して議論した。具体的に AOAC、ISO 文書の相違点の精査から始めた。2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインには、それまでのガイドラインに比べて、いくつかの重要な変更点があった。例えば、定性試験を共同試験で行う場合に、各試験室で分析する検体の数、すなわち繰返し数が、従来の 6 から一挙に 2 倍の 12 となった。しかし、その理由はどこにも記載がないばかりか、AOAC の Board メンバーに直接訊ねても明確な答えが返ってこなかった。そこで、文献のみならず、AOAC や ISO/TC34/SC9 などの国際会議での議論を通じて、そのような世界動向を、調査分析した。さらに、ISO16140 は 2016 年 6 月に大幅な改定が行われ、ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」となったので、Part1 の内容を参照しつつ、Part2 の章構成に合わせたガイドラインを作成した。

### (2) 微生物生菌標準物質の実用化を目指す開発研究

#### (イ) 食品中の 1 細胞検出

サルモネラ 4 株 ( $H_2S$  産生菌 2 株、 $H_2S$  非産生菌 2 株) について、最適調製条件を求めた。次に、この中から各 1 株 *Salmonella* Typhimurium FSD 287 ( $H_2S+$ ) *Salmonella* Westhampton FSD 347 ( $H_2S-$ ) を選び、食品マトリクス (冷凍エビ、牛肉) に少数生菌を添加した。

(ロ) 冷凍食品などで問題になる損傷菌について、標準物質の調製の可能性を検討した。損傷菌はその生成の原因の違いによって状態が異なると思われる。本研究では、高濃度スクロースによる浸透圧

ストレスによって、損傷菌が起こる、との知見に基づき、その、コロニー形成過程に及ぼす影響を調べた。

### (ハ) オフサイトでの生菌標準物質の調製

オフサイトでも利用するためには、国内外、何れの場所を想定しても 1 週間ほどの保存安定性があれば十分と考えた。そこで、生菌標準物質調製後 1 週間の一時保存法について検討した。すなわち、保存中の細胞分裂を抑制しつつ、かつ使用時にはコロニー形成能を抑制しない方法について検討した。

## C. 研究結果

### (1) バリデーション・ガイドラインの作成

当初、AOAC2012 版、及び想定される ISO 改訂版で示されている内容に沿って、ガイドライン原案を作成しながら、両方で異なる点を調査し、議論してきたが、2016 年 6 月の ISO16140 改訂版では、改めて大幅な内容変更があった。Part1 の別冊化に伴い、用語、訳語の整理に重点を置いた。例えば、キーワードである「validation」は、従来「妥当性確認」と訳してきたが、具体的な内容の理解の普及度を鑑み直接「バリデーション」というカタカナ表記にすることとした。また「study」も頻出する言葉であり、従来「研究」や「試験」と訳してきたが、他分野で使用されてきた研究や試験とは、内容や概念が非常に異なるので、これも直接「スタディ」とカタカナ表記にすることとした。これらの議論を経て、通知文書にできる形のバリデーション・ガイドラインの作成作業を進め、本文の部分について大略完成した。

### (2) 微生物生菌標準物質の開発

#### (イ) 食品中のサルモネラ 1 細胞の検出

サルモネラ定性試験法 (NIHSJ 標準法)

及び測定キットで行い、いずれの方法でも1細胞を添加した2種類の食品の両方法で、1細胞検出ができることが示された。その結果について、AOAC INTERNATIONALでのサイエンス・セッションで、「生菌標準物質(Standard Material of Viable Microbial Cells)」と題するサイエンス・セッションを実施し、司会を務めると共に、自ら、講演者の一人として、これまでの研究成果を報告した。

#### (ロ) 損傷菌の標準物質

試験菌として *Escherichia coli* ATCC 8739 のコロニー形成過程を自動計測し、コロニー形成開始時間と最終的なコロニー形成率を調べた。その結果、スクロース 20%処理細胞から出発して、最終的に傷害菌標準物質として利用できそうな画分を得ることができた。

#### (ハ) オフサイトでの生菌標準物質の調製

チミジン-ゼラチン重層法が有効であることを確認した。すなわち、予め10 cmシャーレ内に調製しておいたTSA上にチミジン-ゼラチン重層を置き、常温で5min程度静置してチミジン-ゼラチン重層を液体状にした後、TSA上に広げた。この方法で、1週間保存中に細胞分裂はせず、保存後100%のコロニー形成率を示した。5個、10個を滴下した試料でも、各々85%、90%のコロニー形成率を示した。以上により、オフサイトで調製した生菌標準物質が遠隔地へ輸送して利用できる見通しを得た。

## D. 結論

AOACの改訂(2012.2)、ISO 16140の改訂が進む中で、食品マトリクス分類の考え方や汚染食品菌濃度条件など、基本的事項が大幅に改訂される動向に対応して、我が国における妥当性確認ガイドラインの作成を進めてきた。作成されたガイドラインは、ISO 16140: 2016改訂版に基づいており、一連のNIHSJ標準法の妥当性の根拠ともなる内容である。

一方、生菌標準物質に関しては、サルモネラ単一生菌の食品添加試験での検出に成功し、汚染食品菌濃度の調製法における不確かさを、合理的かつ抜本的に解決できる見通しが得られた。また損傷菌標準物質の調製、オフサイトでの生菌標準物質の調製は、実用的見地から大きな成果である。

## E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表(\*は添付)

### (原著論文)

1. \*H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.*, 5:10061 (2015) doi:10.1038/srep10061
2. \*H. Matsuoka, K. Nakano, N. Takatani, T. Yoshida, S. Igimi, M. Saito: A flow cytometric method for the in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. *J. AOAC Int.* 97(2), 479-483 (2014).

### (国際学術集会)

1. H. Matsuoka: Key Technology for a More Rational Validation — Standard Material of Viable Microbial cells (SMVM)— . 1st Asia Pacific Food Microbiology Advisory Board Meeting organized by bioMérieux, December 2-3, 2015, Seoul, Korea.
2. H. Matsuoka, R. Johnson (Organizers): Standard Material of Viable Microbial Cells (SMVM). AOAC International 128th Annual Meeting

and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.

3. H. Matsuoka: Order-made SMVM prepared in situ toward the application to broad spectrum of strains. AOAC International 128<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.
4. M. Saito, T. Yoshida, N. Takatani, H. Ogawa, S. Igimi, H. Matsuoka: Application of made-to-order standard material of viable microbial cells (SMVM) to the evaluation of agar media. AOAC International 128<sup>th</sup> Annual Meeting and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.

#### (国内学術集会)

1. 齊藤美佳子、高谷周督、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法. 第43回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2016.9.26).
2. 齊藤美佳子、吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、松岡英明: 浸透圧ストレスによって調製した傷害菌モデルの性質. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).
3. 小川廣幸、松岡英明、齊藤美佳子: タイムラプス影像解析法による寒天培地の性能評価. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).
4. 松岡英明: 微生物試験迅速法におけるバリデーションとデファクトスタンダードの課題: 日本防菌防黴学会女性研究者の会、第14回学術講演会、東京 (2015.4.23).
5. 齊藤美佳子、A. Mariogani、高谷周督、吉田智紀、小川廣幸、松岡英明: オンサイト調製型標準生菌を利用した寒天培地性能の定量的評価. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)
6. 吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、齊藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 傷害菌の定量的指標の提言—傷害菌調製条件の検討—. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.24)
7. 高谷周督、吉田智紀、小川廣幸、齊藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 傷害菌の定量的指標の提言—傷害修復培地成分の性能評価—. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.24)
8. 守山隆敏、平井誠恵、島原義臣、齋藤健太、中島和英、吉田智紀、高谷周督、齊藤美佳子、松岡英明: オンサイト調製型標準生菌を用いたサルモネラ単一生菌検出による簡易迅速法サルモネラ属菌測定用システムの性能評価. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.24)
9. 松岡英明: AOACを中心とした微生物試験法バリデーションの最新情報. 日本防菌防黴学会第42回通常総会敷設講演会、大阪 (2014.5.28)

#### その他(アピールなど)

- (1) 我が国における微生物試験標準法の策定に際して、国内の公定法と国際的な参照法とのハーモナイゼーションは、大きな課題であったが、常に国際動向を注視しつつ議論を進めてきたことが、多くの NIHSJ 標準法の作成に繋がり大きな実績となった。間もなく完成する日本語版の妥当性確認ガイドラインは最新の ISO 16140 に基づくもので、行政的にも学術的にも、国際的視野に立った議論の規範となりえるもので、その意義は極めて大きい。
- (2) 生菌標準物質の開発研究の成果は、微生物学の根本的命題である「コロニーとは何か？」に対する答えを提

供できる可能性もある。食品微生物試験のバリデーション方法論の革新にとどまらず、微生物学や細胞生物学などの基礎科学に対しても大きな貢献を成すことが期待される。

